

AG1478 and metalloproteases by the pan inhibitor actinonin. Heparin-Binding EGF (HB-EGF), the metalloprotease TACE, and thrombomodulin were neutralized with monoclonal antibodies. Released soluble thrombomodulin was concentrated by ultrafiltration and quantified by ELISA. Static adhesion assays were performed with monocytic U937 cells labelled with calcein and incubated for 1 h with endothelial cells.

Thrombin (20 nM) activated the EGFR and its downstream effectors, the soluble tyrosine kinase Src and the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), ERK1/2 and p38. Src phosphorylation was abolished by both actinonin and anti-thrombomodulin. Activation of ERK1/2 and p38 was also inhibited by actinonin and anti-thrombomodulin, but only by 50%. Mutant thrombin and recombinant thrombomodulin stimulated the phosphorylation of EGFR and Src only, suggesting that PAR-1 signalling is required for MAPK activation. As expected, AG1478 suppressed thrombin-activated phosphorylation of Src and ERK1/2. However, neither anti-TACE nor anti-HB-EGF had any effect, indicating the participation of other metalloprotease and EGFR ligand. Interestingly, thrombin induced actinonin-sensitive release of soluble thrombomodulin. Inhibition of the thrombomodulin pathway by incubating for 4 h endothelial cells with both anti-thrombomodulin and thrombin twice increased the adherence of U937 monocytes compared to thrombin alone. Noteworthy, addition of soluble thrombomodulin during adhesion restored the adherence to the level of isotype-treated cells.

In conclusion, soluble thrombomodulin may negatively modulate the thrombin-induced monocyte adhesion through activation of EGFR signalling.

J011

IMPACT DE LA LONGUEUR DE CHAÎNE DES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 ALIMENTAIRES SUR LES RÉCEPTEURS ADRENERGIQUES ET LES RÉCEPTEURS À LA RYANODINE CARDIAQUES

A. BROCHOT¹, P. WEILL², A. GRYNBERG¹, D. ROUSSEAU-RALLIARD¹

¹ INRA-UPS XI, UMR 1154, Châtenay-Malabry, France

² VALOREX, Combourtillé, France

Dans un précédent travail, nous avons démontré que pour avoir les mêmes effets sur la régulation de la fréquence cardiaque (FC) avec un régime enrichi en acide alpha-linolénique (ALA) il fallait attendre 6 mois de régime alors qu'avec un régime enrichi en acide docosahexaénoïque (DHA) ces effets sont observés dès 2 mois de régime. Nous avons émis l'hypothèse que le retard des effets fonctionnels observés avec l'ALA serait lié à une modification de paramètres impliqués dans le couplage excitation-contraction. Nous avons analysé, après 2 et 6 mois de régime, la densité et l'affinité des récepteurs beta-adrénérergiques (β -AR) et des récepteurs à la ryanodine (RyR), ainsi que la capacité des cardiomyocytes isolés adultes à produire de l'AMPc en réponse à des doses croissantes d'isoprotérénol. Des rats mâles Wistar ont été alimentés pendant 2 ou 6 mois avec 3 régimes (CTL sans n-3, enrichi en ALA ou en DHA) (n=10). Deux séries de rats ont été sacrifiées et le cœur prélevé, l'une pour analyse des récepteurs, l'autre pour isoler les cardiomyocytes pour évaluer l'effet-dose de l'isoprotérénol sur la production d'AMPc. Les résultats montrent une diminution de l'affinité des β -AR (ligand CGP) pour les groupes n-3 par rapport au CTL à 2 et 6 mois, avec une meilleure réponse adrénérergique (dès 2 mois pour le groupe DHA et à 6 mois pour le groupe ALA) mise en évidence par la diminution de

l'EC50 de l'isoprotérénol dans la production d'AMPc. L'affinité des RyR a été augmentée notamment dans le groupe ALA à 6 mois. La densité des 2 types de récepteurs a augmenté dans les deux groupes n-3 à 2 mois. Mais cette augmentation est transitoire dans le groupe ALA alors qu'elle se maintient dans le groupe DHA. En conclusion, ces résultats montrent une meilleure réponse bêta-adrénérergique pour les groupes n-3 par rapport au CTL dès 2 mois pour le DHA et après 6 mois pour le groupe ALA. Les effets sur la FC, précédemment observés, passeront donc par une modification de la capacité des β -AR à produire l'AMPc en réponse à l'isoprotérénol.

J012

CYCLOOXYGENASE-2-DEPENDENT ISOPROSTANE PRODUCTION IN HYPOXIA-INDUCED PULMONARY HYPERTENSION

E. DELANNOY¹, A. COURTOIS¹, V. LEBLAIS¹, R. MARTHAN¹, B. MULLER¹

¹ Inserm U885, Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France

This study investigates the contribution of contractile prostanoids in hyper-reactivity of pulmonary arteries to vasoconstrictors, in a mice model of hypoxic pulmonary arterial hypertension.

Male C57BL/6 mice were exposed or not to hypobaric hypoxia (0.5 atm) for 21 days. Extrapulmonary arteries were removed and used for evaluation of vasomotor responses (using wire myograph), for expression and localisation of cyclooxygenases and thromboxane A2 (TXA2)-synthase (by western blotting and immunofluorescence) and for release of vasoactive prostanoids (by ELISA).

In pulmonary arteries from hypoxic mice (but not in those from normoxic mice), arachidonic acid (30 μ M) induced a contractile effect, that was converted into relaxation in the presence of SQ29548 (0.5 μ M), a thromboxane receptor (TP) antagonist. In these arteries, contraction to phenylephrine (3 μ M) was enhanced about 1.8 fold increase compared to controls, in both endothelium-intact and denuded preparations. This hyper-reactivity to phenylephrine was diminished by SQ29548, by the selective COX-2 inhibitor NS398 (1 μ M), but not by the phospholipase A2 inhibitor AACOCF3 (30 μ M), the COX-1 inhibitor SC560 (0.1 μ M) or the TXA2-synthase inhibitor furegrelate (100 μ M). None of these agents affected contraction to phenylephrine in pulmonary arteries from normoxic mice. Expression of COX-1, which was found in all layers of pulmonary arteries, was decreased by chronic hypoxia as well as expression of TXA2-synthase. COX-2 expression was restricted to the medial layer of pulmonary arteries. Hypoxia decreased the release of TXA2 and the release of PGI2 from pulmonary arteries, while it increased the release of 8-iso-PGF2 α (an isoprostane derivative that is a marker of oxidative stress). NS398 abolished hypoxia-induced elevation of 8-iso-PGF2 α release from pulmonary arteries. Finally, 8-iso-PGF2 α induced a contractile effect in pulmonary arteries, which was blunted by SQ29548. Moreover, 8-iso-PGF2 α markedly potentiated contraction to phenylephrine.

These data show that following chronic hypoxia, pulmonary arteries exhibited alterations in arachidonic acid pathway, and hyper-responsiveness to phenylephrine. The latter is likely mediated by COX-2-dependent production of 8-iso-PGF2 α , which in turn activates TP receptor. Such mechanisms probably contribute to elevation in pulmonary arterial resistance in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension.

Grant: Fondation de France, ANR